

PCT/EP 03/04100

MODULARIO
LCA - 104



Mod. C.E. - 1-4-7

04.07.2003

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

REC 24309, 2003	
WIPO	PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:

Invenzione Industriale

N.

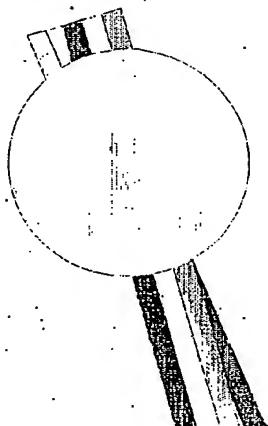
MI2002 A 000872



*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, li 2 MAG. 2003



IL FUNZIONARIO

Giampietro Carlotta
Giampietro Carlotta

BEST AVAILABLE COPY

AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione INDENA S.p.A.

Residenza Milano

codice 04411780150

2) Denominazione

Residenza

codice

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Bianchetti Giuseppe ed altri

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza Bianchetti Bracco Minoja s.r.l.

via Rossini

n. 8

città Milano

cap 20122

(prov) MI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via

n.

città

cap

(prov)

D. TITOLO

classe proposta (sez./cl./scd)

gruppo/sottogruppo

"Derivati dell'iperforina, loro uso e formulazioni che li contengono"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI

1) Bombardelli Ezio

3) Riva Antonella

2) Morazzoni Paolo

4) Fuzzati Nicola

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

1)

2)

SCIoglimento RISERVE

Data N° Protocollo

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) 12 PROV n. pag. 117

Doc. 2) 10 PROV n. tav. 1

Doc. 3) 11 RIS

Doc. 4) 10 RIS

Doc. 5) 10 RIS

Doc. 6) 10 RIS

Doc. 7) 10

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale

designazione inventore

documenti di priorità con traduzione in italiano

autorizzazione o atto di cessione

nomativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale Euro Centottantotto/51#

COMPILATO IL 23/04/2002

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Bianchetti Giuseppe

obbligatorio

CONTINUA SI/NO NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

CAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI MILANO

MILANO

codice 1851

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI2002A 000872

Reg. A

L'anno

DUEMILADUE

VENTITRE

del mese di APRILE

Il(I) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda di brevetto, con allegati, 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

Salvatore Muto

dell'Ufficio

L'UFFICIALE ROGANTE

M. CORTONESI

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

DATA DI DEPOSITO 23/04/2002

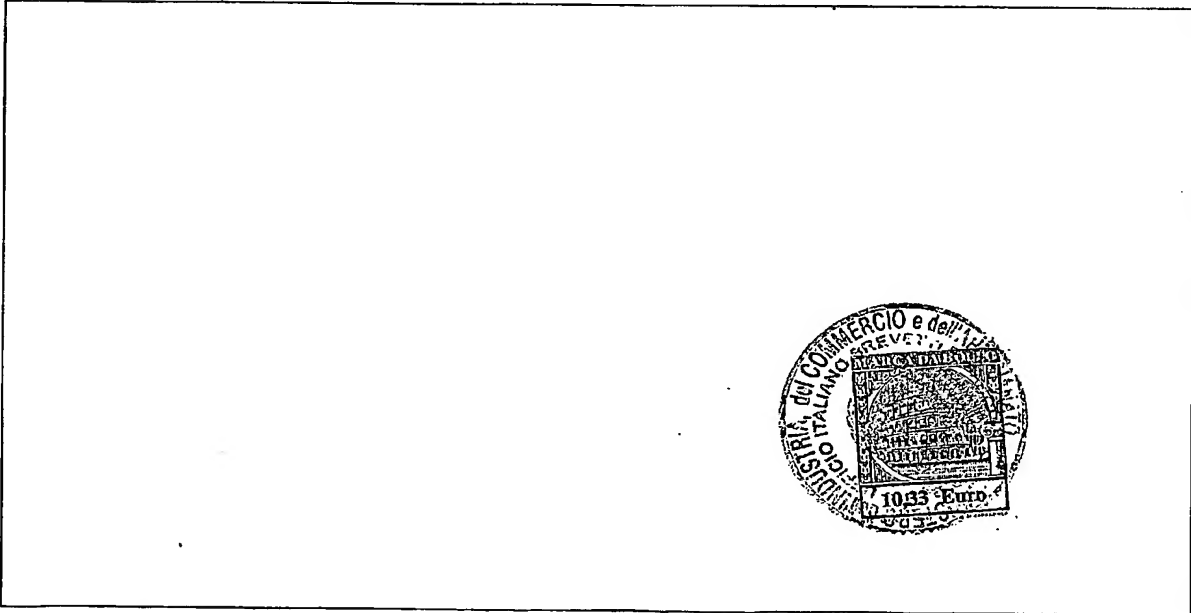
DATA DI RILASCIO 11/11/11

D. TITOLD

L BIASSUNTO

Si descrive l'uso di prodotti di riduzione dell'iperforina e dell'adiperforina, dei loro sali o esteri farmaceuticamente accettabili in campo farmaceutico e/o nutrizionale nel trattamento degli stati di depressione, di ansia e del morbo di Alzheimer.

M. DISEGNO

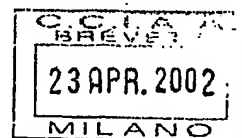


6789 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

MV/mgg **"DERIVATI DELL'IPERFORINA, LORO USO E FORMULAZIONI
CHE LI CONTENGONO"**

a nome : INDENA S.p.A.

con sede in : Milano



* * *

CAMPO DELL'INVENZIONE

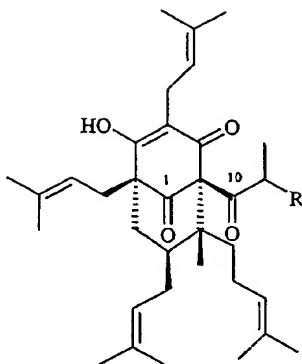
MI 2002 A 0 0 0 8 7 2

La presente invenzione riguarda derivati dell'iperforina e dell'adiperforina e il loro uso in campo farmaceutico e/o nutrizionale, in particolare nel trattamento degli stati di depressione, di ansia e del morbo di Alzheimer.

STATO DELLA TECNICA

Le sommità fiorite di *Hypericum perforatum* contengono numerose classi di sostanze strutturalmente diverse, tutte dotate direttamente o indirettamente di attività a livello del sistema nervoso centrale. I meccanismi d'azione di questi composti sono differenti e comprendono un'azione anti-MAO (Suzuki O. et al. *Planta Med.*, 272-4, 1984), un'azione sul rilascio e sul re-uptake della serotonina (Muller W.E. et al. *Pharmacopsychiatry*, 30, 102-107, 1997) ed un'attività benzodiazepino-simile (Coot J.M. *Pharmacopsychiatry* 30,108-112, 1997).

L'iperforina, un derivato della floroglucina, è uno dei maggiori costituenti della frazione lipofila delle sommità fiorite di *Hypericum perforatum*; tale frazione, anche se in concentrazione minore, contiene anche adiperforina, omologo superiore dell'iperforina (Erdelmeier C.A.J., *Pharmacopsychiatry*, 31, 2-6, 1998).

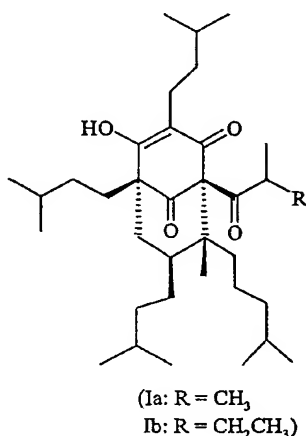


iperforina: R = CH₃
adiperforina: R = CH₂CH₃

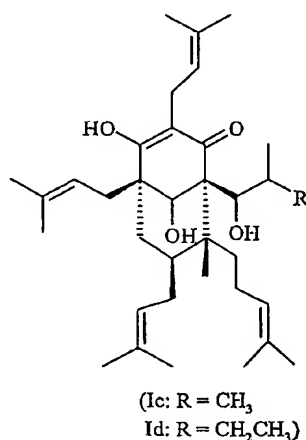
L'iperforina è stata recentemente oggetto di numerosi studi attraverso i quali è stato possibile stabilire il suo importante ruolo antidepressivo (Pharmacopsychiatry, 31 Suppl.1, 1-60, 1998). È noto inoltre che gli estratti di *Hypericum perforatum* possono essere utilizzati per la profilassi ed il trattamento di malattie neurodegenerative, fra le quali il morbo di Alzheimer (WO/9940905, WO0057707). In particolare, sono stati descritti a questo scopo (WO9941220) sali dell'iperforina e dell'adiperforina con cationi inorganici o con sali d'ammonio.

E' noto dalla letteratura che l'iperforina, in condizioni normali di estrazione e conservazione, è poco stabile; secondo WO 97/13489 il contenuto di iperforina in un estratto idroalcolico di iperico si riduce drasticamente già dopo poche settimane. Sempre secondo WO 97/13489, per ottenere estratti stabili di iperforina, occorre la presenza di antiossidanti in tutte le fasi di lavorazione (estrazione, purificazione e conservazione). Se ne deduce quindi che l'alto grado di instabilità dell'iperforina la rende poco maneggevole per la preparazione di composizioni farmaceutiche. Per ovviare a tale inconveniente, recentemente sono stati preparati composti più stabili dell'iperforina, tra cui i sopracitati sali descritti in WO 99/41220 e derivati funzionalizzati sull'ossidrilico (WO 99/64388).

È noto inoltre (Bystrov et al., Bioorg. Khim, 1978) che iperforina ed adiperforina possono essere trasformate nei corrispondenti ottaidroderivati, ottaidroiperforina (Ia) e ottaidroadiperforina (Ib), per riduzione catalitica delle catene isopreniche laterali



o nei corrispondenti tetraidroderivati, tetraidroiperforina (Ic) e tetraidroadiperforina (Id), per riduzione con idruri metallici dei gruppi chetonic in posizione 1 e 10 a gruppi idrossilici.

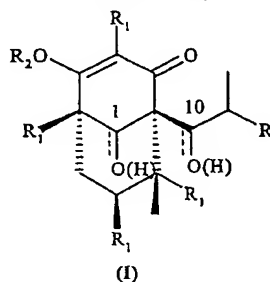


DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Si è ora trovato che derivati dell'iperforina e dell'adiperforina ottenibili

per riduzione di tutti i doppi legami delle catene isopreniche e/o per riduzione delle funzioni chetoniche in posizione 1 e 10 a gruppi idrossilici non solo sono dotati di elevata stabilità, ma possiedono anche attività antidepressiva, ansiolitica ed anti-neurodegenerativa sorprendentemente superiori a quella dell'iperforina e dell'adiperforina.

Oggetto della presente invenzione è pertanto l'uso di derivati dell'iperforina e dell'adiperforina di formula (I)



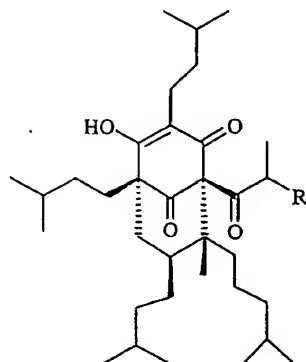
in cui R rappresenta metile o etile, R2 rappresenta idrogeno, un catione di base inorganica o organica farmaceuticamente accettabili o un residuo acilico C2-C5, lineare o ramificato e in cui, alternativamente:

- a) R1 rappresenta 3-metil-but-1-il e in posizione 1 e 10 sono presenti gruppi osso;
- b) R1 rappresenta 3-metil-2-buten-1-il e in posizione 1 e 10 sono presenti gruppi idrossi;
- c) R1 rappresenta 3-metil-but-1-il e in posizione 1 e 10 sono presenti gruppi idrossi

per la preparazione di medicinali, in particolare per la preparazione di farmaci per la terapia della depressione e per la terapia del morbo di Alzheimer.

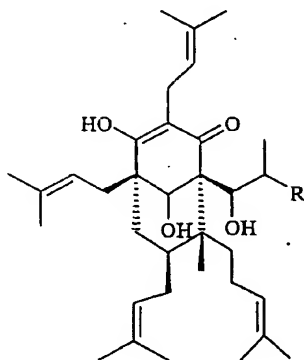
Fra i composti di formula (I) come definiti al punto a) è preferito l'uso

di quelli in cui R₂ è idrogeno, d'ora in poi definiti ottaidroiperforina (Ia) e ottaidroadiperforina (Ib)



(Ia: R = CH₃
Ib: R = CH₂CH₃)

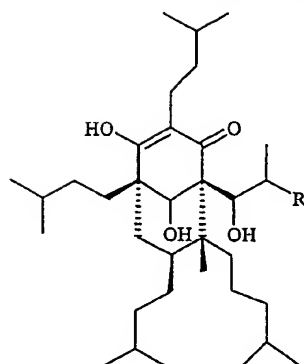
Fra i composti di formula (I) come definiti al punto b) è preferito l'uso di quelli in cui R₂ è idrogeno (d'ora in poi definiti tetraidroiperforina Ic e tetraidroadiperforina Id)



(Ic: R = CH₃
Id: R = CH₂CH₃) ,

ancor più preferito è l'uso di tetraidroiperforina (Ic).

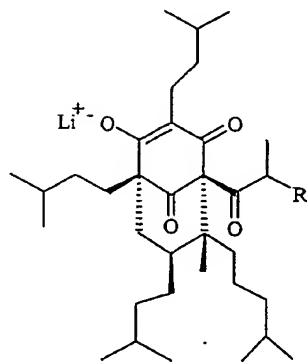
Fra i composti di formula (I) come definiti al punto c) è preferito l'uso di quelli in cui R₂ è idrogeno (d'ora in poi definiti dodecaidroiperforina Ie e dodecaidroadiperforina If).



(Ie): R = CH₃
(If): R = CH₂CH₃

ancor più preferito è l'uso di dodecaidroiperforina (Ie).

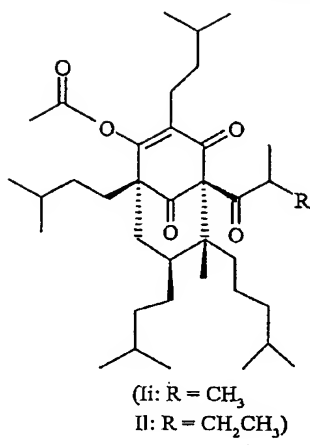
Inoltre, fra i composti di formula (I) come definiti al punto a) è preferito l'uso di quelli in cui R₂ rappresenta litio (ottaidroiperforina sale di litio Ig e ottaidroadiperforina sale di litio Ih)



(Ig: R = CH₃
Ih: R = CH₂CH₃)

ancor più preferito è l'uso di ottaidroiperforina sale di litio (Ig);

e di quelli in cui R rappresenta acetile (acetilottaidroiperforina II e acetilottaidroadiperforina II)



in particolare di acetilottaidroiperforina (II).

Dodecaidroadiperforina (Ie), dodecaidroadiperforina (If), acetilottaidroiperforina (II) e acetilottaidroadiperforina (II) sono composti nuovi e sono anch'essi parte della presente invenzione.

sono composti nuovi e sono anch'essi parte della presente invenzione.

I composti di formula (Ia) e (Ib) vengono ottenuti per riduzione delle catene isopreniche laterali mediante idrogenazione catalitica, utilizzando ad esempio carbone palladiato o Nichel/Raney.

I composti di formula (Ic) e (Id) vengono ottenuti per riduzione dei gruppi chetonici in posizione 1 e 10 con idruri, scelti ad esempio fra NaBH₄, Redal[®], Vitride[®], LiAlH₄.

I composti di formula (Ie) e (If) vengono ottenuti riducendo dapprima le catene isopreniche laterali e poi i gruppi chetonici in posizione 1 e 10 secondo quanto precedentemente descritto.

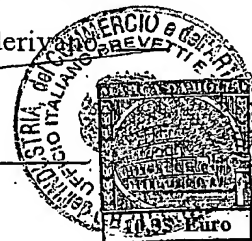
I prodotti di formula (I) in cui R₂ rappresenta un catione di base inorganica o organica o un residuo acilico possono essere preparati dai prodotti di formula (I) in cui R₂ rappresenta idrogeno per salificazione o

esterificazione con metodi convenzionali.

Il procedimento per ottenere i composti dell'invenzione a partire dalle sommità fiorite di *Hypericum perforatum* può così essere riassunto:

Le sommità fiorite di *Hypericum perforatum* possono essere estratte con alcoli o chetoni alifatici puri o loro miscele con acqua o gas in condizioni supercritiche; l'estratto comunque ottenuto si ripartisce fra n-esano e miscele idroalcoliche con alcoli alifatici miscibili con acqua. Si controestrae la soluzione esanica con metanolo alcalino per estrarre iperforina ed adiperforina. Dopo acidificazione si tratta la soluzione metanolica con una resina a scambio ionico debolmente basica, che trattiene selettivamente iperforina ed adiperforina. La resina viene eluita con metanolo acido e l'eluato, dopo concentrazione a piccolo volume, viene diluito con acqua e controestratto con n-esano. Si concentra la soluzione esanica a piccolo volume ed il concentrato è pronto per la derivatizzazione. Si riprende questo residuo in solventi clorurati e si aggiunge del reattivo opportuno secondo le modalità riportate negli esempi.

I composti dell'invenzione hanno mostrato effetto antidepressivo, che è stato valutato nel ratto mediante il forced swimming test, valutando i parametri struggling, floating e swimming secondo quanto descritto da Cervo et al. in Neuropharmacology, 26, 14969-72, 1987. I prodotti sono stati somministrati in 3 dosi: 30 minuti dopo il pre-test, 5 ore e 30 minuti prima del test. I risultati riportati nella tabella sottostante dimostrano che i composti oggetto dell'invenzione risultano più attivi dell'iperforina da cui derivano.



Trattamento	mg/Kg	Struggling (sec.)	Floating (sec.)	Swimming (sec.)
Veicolo		7.0 ± 2.4	174.5 ± 15.9	118.5 ± 15.8
Ottaidroiperforina sale di litio	6.25	63.1 ± 5.8	59.5 ± 11.3	177.4 ± 14.9
Tetraidroiperforina	6.25	51.4 ± 4.1	68.4 ± 7.6	193.4 ± 13.2
Dodecaidroiperforina	6.25	62.13 ± 5.1	55.1 ± 6.2	169.5 ± 10.1
Acetilottaidroiperforina	6.25	73.9 ± 5.9	68.4 ± 5.7	171.9 ± 11.4
Iperforina	6.25	30.4 ± 4.6	60.4 ± 7.3	99.3 ± 10.6
Desimipramina	10	148.3 ± 12.6	53.0 ± 9.2	98.8 ± 7.9

I composti dell'invenzione si sono inoltre dimostrati particolarmente attivi contro il morbo di Alzheimer, grazie alla loro capacità di aumentare l'APPs, forma solubile e non dannosa dell'Alzheimer Precursor Protein (APP). E' noto infatti che la scissione proteolitica dell'Alzheimer Precursor Protein (APP) è mediata sia dalla β - e γ -secretasi, dando luogo ad un'aumentata produzione di peptide amiloide A β 1-42 (che ha un ruolo centrale nel manifestarsi della malattia di Alzheimer), che dalla α -secretasi, dando luogo all'APPs solubile privo di attività patogena (Esler W.P., Wolfe M.S., Science, 293,1449-54, 2001).

L'effetto dei composti dell'invenzione sulla liberazione di APPs prodotto dalla α -secretasi è stato determinato nel mezzo di cultura di una linea cellulare di neuroblastoma (SH-SY5Y) secondo quanto riportato da Galbete J.L. et al. in Biochem J. 348,307-313,2000.

I risultati riportati nella seguente tabella indicano che i prodotti saggati

attivano il metabolismo dell'APP mediato dalla α -secretasi, inducendo un aumento di APPs secreto nel mezzo di cultura:

	APPs %
Controlli	100
Iperforina 10 μ M	296
Ottaidroiperforina sale di Litio 10 μ M	1383
Tetraidroiperforina 10 μ M	926
Dodecaidroiperforina 10 μ M	879
Acetilottaidroiperforina 10 μ M	954

I composti dell'invenzione possono essere formulati, secondo tecniche convenzionali, ad esempio secondo quanto descritto in Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook, XVII ed. Mack Pub., N.Y., U.S.A, in capsule di gelatina molle, capsule di gelatina dura, compresse, supposte; preferenzialmente l'estratto dell'invenzione viene formulato in capsule di gelatina molle o in formulazioni a rilascio controllato. Il dosaggio è compreso fra 10 e 100 mg pro dose nelle formulazioni normali e fino a 200 mg nelle formulazioni a rilascio controllato, essendo in questo caso la dose consigliata di 200 mg pro dose/pro die. I prodotti possono essere inoltre somministrati per via transdermica a rilascio controllato applicando il formulato in zona prossimale alle derivazioni arteriose carotidee cerebrali. I dosaggi di composto in queste formulazioni vanno da 10 a 100 mg pro dose/pro die.

Gli esempi più sotto riportati illustrano l'invenzione in maggior dettaglio.

ESEMPI

Esempio 1 - Preparazione di ottaidroiperforina sale di dicicloesilammonio

50 g di iperforina ottenuta secondo quanto riportato nell'esempio 1

vengono sciolti in 500 ml di acetato d'etile in presenza di 2 g di carbone palladiato al 5% e idrogenati fino a completo assorbimento di idrogeno. Dopo filtrazione del catalizzatore la soluzione etero-acetica viene concentrata a secco nel vuoto ed il residuo viene sciolto in n-esano. Alla soluzione viene aggiunta una quantità stechiometrica di dicicloesilammina, che permette una cristallizzazione sufficientemente selettiva del sale corrispondente.

Si ottengono 62 g del sale di dicicloesilammonio di ottaidroiperforina avente le seguenti caratteristiche spettroscopiche:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz CDCl_3): δ 3.03 (2H, m, CH-DCHA), 2.55-2.30, 2.10-1.76 (20H, m, CH_2 -DCHA), 1.70-1.10 (22H, m, H-4, H-11, CH_2 -5, CH_2 -15, CH_2 -16, CH_2 -17, CH_2 -21, CH_2 -22, CH_2 -26, CH_2 -27, CH_2 -31, CH_2 -32), 0.97-0.83 (24H, d, CH_3 -19, CH_3 -20, CH_3 -24, CH_3 -25, CH_3 -29, CH_3 -30, CH_3 -34, CH_3 -35), 1.19, 1.12 (6H, d, $J = 6.5$ Hz, CH_3 -12, CH_3 -13), 0.91 (3H, s, CH_3 -14).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz CDCl_3): δ 213.1, 211.1, 186.3, 183.6, 119.0, 82.5, 60.8, 53.5, 47.5, 44.2, 41.3, 41.0, 40.9, 38.2, 38.1, 37.8, 33.8, 31.0, 30.7, 30.0, 29.4, 28.8, 28.3, 27.9, 27.1, 25.4, 25.1, 24.9, 23.5, 23.2, 23.1, 22.9, 22.8, 22.7, 22.5, 13.7. ESIMS m/z 567 [$\text{M}+\text{Na}^+$] (100), 1111 [$2\text{M}+\text{Na}^+$] (91).

Esempio 2 - Preparazione di tetraidroiperforina

2 g di iperforina (P.M. = 536,01) sono solubilizzati, sotto agitazione magnetica, in 20 ml di THF; alla soluzione si aggiunge LiAlH_4 in forte eccesso (1 g, 0,026 mol, P.M.= 38). Il decorso della reazione è seguito per TLC (eluente etere di petrolio/EtOAc 9:1 $R_{\text{fp}}=0,6$; $R_{\text{fa}}=0,39$; $R_{\text{fb}}=0,32$; $R_{\text{fc}}=0,22$; $R_{\text{fd}}=0,125$). Dopo dieci minuti la reazione è ultimata.

Per distruggere l'eccesso di reattivo si aggiunge $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ supportato su celite (3:1 in peso): la reazione sviluppa molto calore, pertanto è

opportuno raffreddarla con ghiaccio. Il calore sviluppato fa evaporare parte del solvente. Si filtra su celite e il filtrato viene lavato tre volte con 20 ml di EtOAc. La soluzione viene trasferita in un pallone a un collo da 150 ml e il solvente viene completamente evaporato.

Il prodotto ottenuto viene purificato per cromatografia su colonna.

Si utilizza una colonna da 200 ml impaccata con 100 ml di gel di silice e una miscela eluente etere di petrolio/EtOAc 95:5. Si raccolgono frazioni di eluato da circa 20 ml e si controlla il contenuto in TLC (etere di petrolio/EtOAc 9:1).

Dopo cristallizzazione da metanolo si ottengono 1.5 g del composto desiderato. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz CDCl_3): δ 5.11 (1H, m, H-22), 5.00 (3H, m, H-17, H-27, H-32), 3.11 (1H, dd, $J = 14.0, 7.4$ Hz, CH_2 -26), 2.92 (1H, dd, $J = 14.0, 7.0$ Hz, CH_2 -26), 2.50-1.35 (12H, m, H-4, H-11, CH_2 -5, CH_2 -15, CH_2 -16, CH_2 -21, CH_2 -31), 1.80-1.52 (24H, s, CH_3 -19, CH_3 -20, CH_3 -24, CH_3 -25, CH_3 -29, CH_3 -30, CH_3 -34, CH_3 -35), 1.19-0.95 (9H, d, CH_3 -12, CH_3 -13, CH_3 -14).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz CDCl_3): δ 200.5, 174.3, 134.1, 132.6, 131.2, 130.6, 125.8, 123.9, 122.6, 120.5, 119.4, 79.2, 73.1, 39.6, 37.2, 30.5, 32.8, 31.3, 30.2, 26.1, 26.0, 25.8, 23.5, 23.1, 21.9, 20.0, 18.3, 18.1, 17.8, 15.6.

ESIMS m/z 1103 [$2\text{M}+\text{Na}^+$] (100), 541 [$\text{M}+\text{H}^+$] (25), 563 [$\text{M}+\text{Na}^+$] (12).

Esempio 3 - Preparazione di ottaidroadiperforina sale di litio

15 g di ottaidroiperforina sale di dicicloesilammonio vengono eluiti su una resina acida (Dowex 50X8, 300 g.) con 600 ml di metanolo. Si ottengono 11.01 g di ottaidroiperforina ai quali si aggiungono 0.8745 g di LiOH monoidrato sciolto in acqua. Si evapora a secco ottenendo 4 g di sale di litio avente le seguenti caratteristiche spettroscopiche:



¹H-NMR (300 MHz CDCl₃): δ 1.93-1.00 (22H, m, H-4, H-11, CH₂-5, CH₂-15, CH₂-16, CH₂-17, CH₂-21, CH₂-22, CH₂-26, CH₂-27, CH₂-31, CH₂-32), 1.00-0.80 (24H, d, CH₃-19, CH₃-20, CH₃-24, CH₃-25, CH₃-29, CH₃-30, CH₃-34, CH₃-35), 1.20, 1.06 (6H, d, J = 6.3 Hz, CH₃-12, CH₃-13), 0.91 (3H, s, CH₃-14).

¹³C-NMR (75 MHz CDCl₃): δ 211.4, 191.3, 184.6, 82.7, 61.5, 51.3, 47.7, 41.5, 40.5, 38.2, 37.9, 37.7, 33.9, 30.5, 29.6, 28.7, 28.3, 28.1, 27.1, 23.3, 23.1, 23.0, 22.8, 22.7, 22.4, 22.0, 14.0.

ESIMS *m/z* 551 [M+H⁺] (100), 557 [M+Li⁺] (40), 1102 [2M+H⁺] (71), 1108 [M+Li⁺] (75).

Esempio 4 - Preparazione di dodecaidroiperforina.

1,72 g di dicicloesilammonio ottaidroiperforinato (P.M. = 716; 2,41 mmol) vengono sciolti, sotto agitazione magnetica, in 20 ml di THF; alla soluzione si aggiunge un forte eccesso (3,5 g) di LiAlH₄ (P.M.= 38; 0,092 mol). Il decorso della reazione viene seguito in TLC (eluente etere di petrolio/EtOAc 9:1 R_{fp}=0,6; R_{fa}=0,6; R_{fc}=0,52; R_{fd}=0,18). Dopo dieci minuti la reazione è ultimata.

Si distrugge l'eccesso di reattivo secondo quanto descritto nell'esempio 4. Si filtra la miscela di reazione semisolida lavando accuratamente il residuo con acetato d'etile. La soluzione viene evaporata a secco, il grezzo di reazione viene sciolto in 15 ml di etere di petrolio/etere etilico 3:1 e la soluzione viene trasferita in imbuto separatore da 150 ml. La fase organica viene lavata tre volte con acido solforico 2N e successivamente con acqua salata. La fase acquosa viene eliminata, mentre quella organica, dopo disidratazione su Na₂SO₄, viene concentrata a secco. Il prodotto ottenuto viene purificato per

cromatografia su colonna su 75 g di gel di silice, eluendo il composto desiderato con etere di petrolio/acetato d'etile 99:1. Si ottengono 0.9 g di dodecaidroiperforina avente le seguenti caratteristiche chimico fisiche e spettroscopiche:

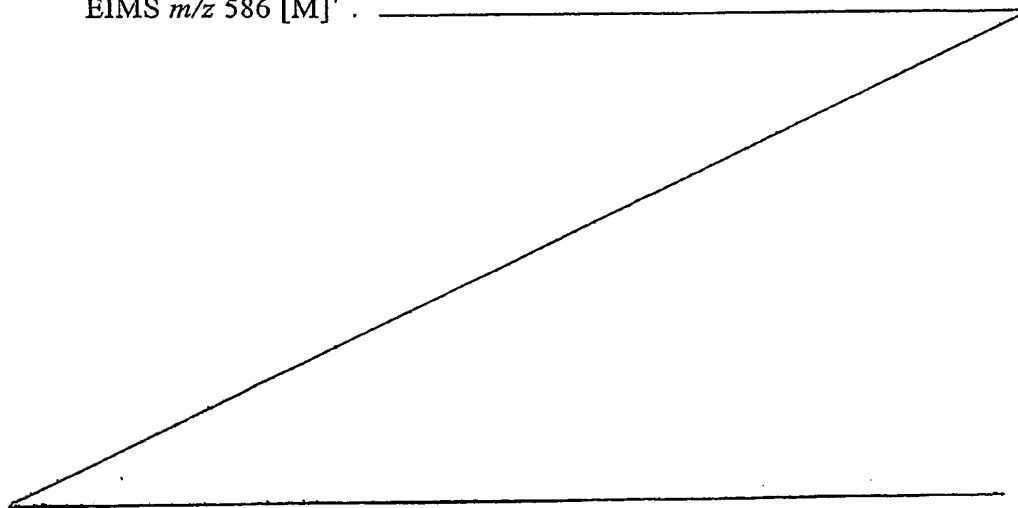
EIMS m/z 548 $[M]^+$.

Esempio 5 - Preparazione di acetil-ottaidroiperforina.

In un pallone a due colli si sciolgono 300 mg di acetiliperforina (P.M.=578; 0,52 mmol) in 3 ml di MeOH, dopodiché si aggiunge il catalizzatore (Pd 5% su carbone). La reazione viene controllata in TLC (etere di petrolio/EtOAc 95:5 R_{fp} =0,43; R_{fa} =0,52). Dopo quattro ore la reazione è ultimata. Il catalizzatore viene separato per filtrazione su un imbuto con filtro sinterizzato ricoperto da uno strato di celite, quindi si evapora il MeOH.

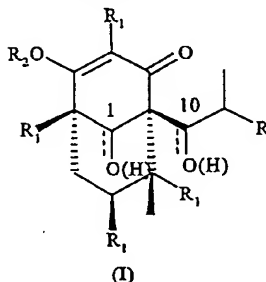
Il prodotto della reazione viene purificato per cromatografia su colonna di 30 g di gel di silice, eluendo il prodotto con una miscela di etere di petrolio/acetato d'etile 9:1. Si ottengono per cristallizzazione da metanolo 150 mg del composto desiderato avente le seguenti caratteristiche spettroscopiche:

EIMS m/z 586 $[M]^+$.



RIVENDICAZIONI

1. Derivati dell'iperforina e dell'adiperforina di formula (I)



in cui R rappresenta metile o etile, R2 rappresenta idrogeno, un catione di base inorganica o organica farmaceuticamente accettabili o un residuo acilico C2-C5, lineare o ramificato e in cui, alternativamente:

- a) R1 rappresenta 3-metil-but-1-il e in posizione 1 e 10 sono presenti gruppi osso;
- b) R1 rappresenta 3-metil-2-buten-1-il e in posizione 1 e 10 sono presenti gruppi idrossi;
- c) R1 rappresenta 3-metil-but-1-il e in posizione 1 e 10 sono presenti gruppi idrossi

per uso come medicamento.

- 2. Derivati secondo la rivendicazione 1 per la preparazione di farmaci per uso nel trattamento della depressione del morbo di Alzheimer.
- 3. Derivati secondo le rivendicazioni 1 o 2 in cui R2 rappresenta idrogeno.
- 4. Derivati secondo le rivendicazioni 1 o 2 in cui R2 rappresenta litio, R1 rappresenta 3-metil-but-1-il e in posizione 1 e 10 sono presenti gruppi osso.
- 5. Derivato secondo la rivendicazione 4 in cui R rappresenta metile.
- 6. Derivati secondo le rivendicazioni 1 o 2 in cui R2 rappresenta acetile,

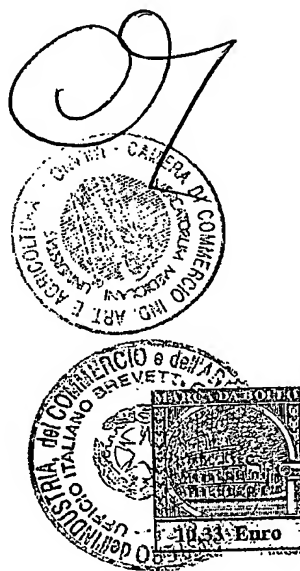
R1 rappresenta 3-metil-but-1-il e in posizione 1 e 10 sono presenti gruppi osso.

7. Derivato secondo la rivendicazione 6 in cui R rappresenta metile.
8. Un composto scelto fra:
dodecaidroiperforina (Ie), dodecaidroadiperforina (If),
acetilottaidroiperforina (Ih) acetilottaidroadiperforina (Ii).
9. Composizioni farmaceutiche contenenti i composti della rivendicazione 4.

Milano, 23 aprile 2002

Il Mandatario
(Bianchetti Giuseppe)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

G. Bianchetti



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.